

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



B23

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 7/00		(11) Numéro de publication internationale: WO 00/28947
A2		(43) Date de publication internationale: 25 mai 2000 (25.05.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02761</p> <p>(22) Date de dépôt international: 10 novembre 1999 (10.11.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/14387 17 novembre 1998 (17.11.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SANOFI-SYNTHELABO [FR/FR]; 174, avenue de France, F-75013 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CASELLAS, Pierre [FR/FR]; 10, rue Carl Von Linne, La Colombe, F-34090 Montpellier (FR). DEROCCQ, Jean-Marie [FR/FR]; 6, rue des Clauzes, F-34570 Murviel les Montpellier (FR).</p> <p>(74) Mandataire: THOURET-LEMAITRE, Elisabeth; Sanofi-Synthelabo, Service Brevets, 174, avenue de France, F-75013 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>
<p>(54) Title: USE OF A SUBSTANCE BINDING WITH THE PERIPHERAL BENZODIAZEPIN RECEPTOR FOR TREATING SKIN STRESS</p> <p>(54) Titre: UTILISATION D'UNE SUBSTANCE SE LIANT AU RECEPTEUR PERIPHERIQUE DES BENZODIAZEPINES DANS LE TRAITEMENT DES STRESS CUTANES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns the use of a substance specifically binding with the peripheral benzodiazepin receptor (PBR) for making a composition for preventing or treating skin stress. The invention also concerns compositions containing said substances. Said compositions can be cosmetic or pharmaceutical, in particular for topical use in dermatology.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne l'utilisation d'une substance se liant spécifiquement au récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) pour la fabrication d'une composition pour la prophylaxie ou le traitement des stress cutanés. L'invention concerne également les compositions contenant ces substances. Ces compositions peuvent être cosmétiques ou pharmaceutiques, en particulier dermatologiques topiques.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun		démocratique de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

UTILISATION D'UNE SUBSTANCE SE LIANT AU RECEPTEUR PERIPHERIQUE DES BENZODIAZEPINES DANS LE TRAITEMENT DES STRESS CUTANES.

La présente invention concerne une composition contenant un ligand des récepteurs périphériques des benzodiazépines pour une utilisation par voie topique.

5 L'invention concerne l'utilisation d'une substance se liant spécifiquement au récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) pour la fabrication d'une composition pour la prophylaxie ou le traitement des stress cutanés.

L'invention concerne également les compositions contenant ces substances. Ces compositions peuvent être cosmétiques ou pharmaceutiques, en particulier dermatologiques topiques.

10 Par stress cutané, on entend les différentes situations qui pourraient provoquer des dommages en particulier au niveau de l'épiderme quelque soit l'agent le provoquant. Cet agent peut être interne et/ou externe à l'organisme comme un agent chimique ou radicalaire ou bien externe comme un rayonnement ultraviolet.

15 La composition selon l'invention est donc destinée à prévenir et à lutter contre les irritations cutanées, les dartres, les érythèmes, les sensations dysesthésiques, les sensations d'échauffement, les prurits de la peau et/ou des muqueuses, le vieillissement et peut aussi être utilisée dans les désordres cutanés tels que, par exemple, le psoriasis, les maladies prurigineuses, l'herpès, les photodermatoses, les dermatites atopiques, les dermatites de contact, les lichens, les prurigos, les prurits, les piqures d'insectes, dans les fibroses et autres troubles de la maturation des collagènes, dans les désordres immunologiques ou encore dans des affections dermatologiques comme l'eczéma.

20 Le ligand PBR, également appelé "substance", contenu dans la composition peut-être un composé non peptidique, un peptide, un extrait de cellules ou de tissus d'origine animale ou végétale ou un produit obtenu par fermentation d'un micro-organisme, par exemple d'une bactérie ou d'un champignon.

De nombreux ligands PBR sont décrits dans la littérature. On peut citer, à titre d'exemple, le Ro 5-4864 ou chlorodiazépam, le Ro 5-2807 ou diazépam, le PK 11195 ou on pourra se référer à l'article Peripheral Benzodiazepine Receptors, Ch. III, 30 J. J. Bourguignon, Ed. E. Giesen - Crouse, Academic Press.

Le PBR est une protéine de 18 KD située sur la membrane externe des mitochondries des tissus périphériques. Il est constitué de cinq domaines transmembranaires et d'une partie carboxyterminale dirigée vers le cytosol. Plusieurs fonctions sont 35 attribuées au PBR selon la nature du tissu considéré : régulation de la stéroïdogénèse, biosynthèse de l'hème, différenciation et croissance cellulaire,

contrôle de la respiration mitochondriale (Krueger KE, Biochimica and Biophysica Acta 1995, 1241, 453-470). Bien que sa fonction précise n'ait pas encore été complètement élucidée, plusieurs données expérimentales récentes suggèrent que PBR pourrait jouer un rôle fondamental dans la régulation des processus de mort cellulaire programmée et dans la protection anti-radicalaire.

Il a été montré que PBR est en effet étroitement associé au niveau de la mitochondrie avec des protéines régulatrices de l'apoptose telles que Bcl2 qui prévient la rupture du potentiel de membrane mitochondriale empêchant ainsi l'apoptose induite notamment par la production de radicaux oxygénés réactifs (Marchetti P. *et al*, J. Exp. Med. 1996, 184, 1155-1160) ; (Marchetti P. *et al*, J. Immunol. 1996, 157, 4830-4836).

Dans le cadre de la présente invention, le rôle protecteur anti-radicalaire de PBR a été directement observé sur des cellules d'origine hématopoïétique pour lesquelles une corrélation étroite entre la densité de PBR et la protection anti-radicalaire a été mise en évidence. De plus, dans cette même étude, il a été démontré que la transfection de PBR sur des cellules dépourvues de ce récepteur confère une protection contre les dommages causés par des espèces oxygénées (Carayon P. *et al*, Blood 1996, 87, 3170-3178).

Plusieurs données de la littérature indiquent que PBR jouerait un rôle important dans la régulation des processus apoptotiques et la protection des cellules *vis-à-vis* des dommages causés par les radicaux libres.

Des études phylogéniques récentes renforcent cette nouvelle notion que PBR agit en tant que modulateur d'apoptose impliqué dans des fonctions antioxydantes. Des similarités significatives existent en effet entre PBR et la protéine CrkK de *Rhodobacter sphaeroides*, une bactérie photosynthétique. Cette protéine bactérienne qui fonctionne comme un détecteur d'oxygène photosensible, régule l'expression des gènes impliqués dans la photosynthèse en réponse à des modifications environnementales de la tension en oxygène et de l'intensité lumineuse. La comparaison entre PBR et CrkK révèle une identité de 35 % et une conservation de séquence entre ces deux protéines qui ont divergé dans la phylogénie il y a deux milliards d'années. Cette homologie suggère une fonction hautement spécialisée et conservée de PBR qui semble similaire à celle de CrkK dans la bactérie. En effet, il a été démontré récemment que le PBR de mammifère transfecté chez des mutants *Rhodobacter* CrkK complémente la fonction détecteur d'oxygène de CrTK. Ainsi, cette étude suggère un rôle clé de PBR dans la transduction des signaux dépendant de l'oxygène (Yeliseev AA., *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1997, 94, 5101-5106).

Cependant, à ce jour, aucune substance n'a jamais été précisément indiquée comme ligand spécifique des récepteurs PBR cutanés.

A plus forte raison, aucune substance active par voie topique et se liant spécifiquement aux récepteurs PBR n'a jamais été décrite dans la littérature.

5 Il a été maintenant montré, dans le cadre de la présente invention, que PBR est abondamment exprimé au niveau de la peau sur les différents compartiments cellulaires qui la composent : kératinocytes, cellules de Langerhans, follicules pileux et cellules endothéliales de la vasculature dermique. Au niveau de la peau, l'expression de PBR suit un gradient croissant de la couche basale vers la couche cornée. Cette
10 organisation remarquable qui privilégie les cellules différenciées de l'épiderme les plus exposées aux stress externes revêt sans doute une signification physiologique de première importance pour la protection des zones de l'épiderme les plus vulnérables. Les études subcellulaires réalisées en microscopie confocale indiquent comme attendu une colocalisation de PBR avec Bcl2 au niveau de la mitochondrie. Les études
15 histologiques sur coupe de peau ont permis de mettre en évidence une répartition surprenante de PBR (Figures 1 et 2).

En effet, l'expression de ce récepteur au niveau de l'épiderme suit un gradient de densité croissant des couches basales vers les couches les plus différenciées de kératinocytes. Cette distribution spatiale très organisée qui privilégie en terme de
20 densité les cellules de l'épiderme les plus externes et donc les plus exposées, laisse supposer que PBR au niveau de la peau pourrait représenter un système de protection naturelle contre les radicaux libres générés par l'exposition aux rayonnements ultraviolets. L'observation concomitante que la distribution de la protéine antiapoptotique Bcl2 obéit à un gradient strictement inverse suggère un rôle
25 compensatoire de PBR pour la préservation des cellules les plus différenciées.

L'ensemble de ces données qui suggèrent une fonction protectrice du PBR, plus particulièrement au niveau de l'épiderme, a conduit à la mise en évidence de ligands naturels ou de synthèse montrant que leur interaction avec PBR pouvait être
30 bénéfique dans différentes situations de stress cutané provoqué par des agents chimiques ou radicalaires ou encore consécutifs à une exposition UV.

Ainsi, selon l'un de ses aspects, la présente invention concerne l'utilisation d'un ligand spécifique du PBR, le Ro 5-4864 dans les stress cutanés. Ce ligand est un agoniste du PBR.

Selon un autre aspect de l'invention et sur la base de ces observations, un screening
35 visant à rechercher des ligands naturels de PBR a été entrepris et a permis d'isoler plusieurs fractions capables d'interagir avec ce récepteur. L'effet potentiellement

protecteur de ces ligands naturels a ensuite été évalué dans différents tests induisant un stress cutané et notamment des tests d'érythèmes cutanés induits par irradiations UV. Les propriétés anti-radicalaires ainsi que les capacités de réparation cutanée ont également été recherchées.

- 5 Des essais biochimiques et pharmacologiques ont été utilisés pour mettre en évidence l'activité et l'intérêt des substances dans divers stress cutanés.

Les essais réalisés avec PBR ont pour but de montrer son implication potentielle dans la régulation des processus apoptotiques et la préservation des cellules cutanées vis-à-vis de différents stress délétères.

10

EXEMPLE 1

Eudes immuno-histologiques de localisation de PBR au niveau cutané

- 15 A l'aide de l'anticorps spécifique anti-PBR, Ac 8D7 (mAb de souris anti-PBR, isotype IgG1, Dussossoy *et al.*, Cytometry, 1996, 24:39-48), une analyse par Western Blot a permis de mettre en évidence la présence abondante de PBR sur six lignées différentes de kératinocytes humains ainsi que sur la peau humaine normale (Figure 1). Au niveau subcellulaire, les analyses réalisées en microscopie confocale confirment sur les kératinocytes une colocalisation de PBR au niveau mitochondrial (Figure 2).

- 20 Une étude immuno-histologique réalisée sur une coupe d'épiderme humain normal à l'aide du même anticorps révèle un ordonnancement très particulier puisque l'expression de PBR augmente du *stratum basale* vers le *stratum corneum*. Ce récepteur est donc abondamment présent sur les kératinocytes les plus différenciés situés directement sous le *stratum corneum* (Figure 3).

25

EXEMPLE 2

Etudes de liaison et de spécificité

- 30 Les études de liaison ou binding ont été réalisées sur la lignée de kératinocytes A-431 (carcinome épidermoïde humain (ATCC, CRL-1555)) par déplacement du ligand de référence [³H]-PK11195. L'analyse de Scatchard indique un seul site de fixation, une densité d'environ 470.000 récepteurs par cellule et une forte affinité du ligand (KD = 1,5 nM) (Figure 4). La spécificité du binding sur le récepteur périphérique porté par les kératinocytes est attestée par les études pharmacologiques qui montrent une efficacité décroissante du déplacement du ligand périphérique de référence (PK 11195) par les
- 35 ligands suivants :

Ro 5-4864 = ($CI_{50} \approx 25$ nM) > diazepam ($CI_{50} \approx 100$ nM) >>> clonazepam (inactif à 3200 nM). Il est rappelé que ce dernier est un ligand du récepteur central des benzodiazépines, le diazepam est mixte, le Ro 5-4864 est spécifique du PBR (Figure 5).

5

EXEMPLE 3

Implication du PBR dans la protection contre les radicaux oxygénés

Deux types d'expériences sont décrites à la Figure 6. La première a consisté à comparer différentes lignées d'origine lymphoïde ou myéloïde pour leur capacité à résister à la toxicité des radicaux oxygénés en relation avec leur niveau d'expression de PBR. Les résultats indiquent une très forte corrélation entre le nombre de sites PBR par cellule et la résistance à la toxicité induite par l' H_2O_2 . Il existe également une corrélation similaire lorsque l'on considère cette fois le niveau d'expression de Bcl2, protéine connue pour protéger les cellules des dommages oxydatifs. Cette donnée, jointe au fait que Bcl2 et PBR sont deux protéines localisées sur la membrane externe des mitochondries, suggère qu'elles pourraient présenter des fonctions communes dans la protection cellulaire. De façon intéressante, alors que l'expression de PBR suit un gradient de densité croissant de la couche basale vers la limite de la couche cornée, les données de la littérature indiquent un phénomène inverse pour l'expression de Bcl2, suggérant qu'au cours de la différenciation des kératinocytes, PBR pourrait prendre le "relais" de Bcl2 en ce qui concerne les fonctions de protection anti-radicalaire.

Dans la deuxième expérience, le rôle possible de PBR dans la protection *vis-à-vis* de la toxicité des radicaux libres est renforcé par la démonstration de la meilleure viabilité, en présence d' H_2O_2 , de cellules Jurkat transfectées PBR+ en comparaison avec des cellules homologues PBR-.

EXEMPLE 4

L'activité anti-apoptotique des actifs a été mesurée sur des kératinocytes humains et des fibroblastes (ATCC) qui ont étéensemencés dans des boîtes de Pétri de 35 mm (5×10^5 cellules/puits) dans le DMEM (Dubelco's Mode Eagle Medium) additionné de 10 % de sérum de veau foetal et laisser proliférer jusqu'à confluence. Ce milieu de culture est ensuite aspiré, les cellules sont rincées et 0,1 % de sérum de veau foetal est ajouté en présence d'une solution saline. Des concentrations croissantes de la substance à étudier sont additionnées. Vingt quatre heures plus tard, l'apoptose est mesurée avec une trousse de dosage ELISA (de l'anglais "enzyme-linked

immunosorbent assay").

Des kératinocytes ont été soumis à des rayonnements ultraviolets de type B (UVB) à la dose de 250J/m² pendant 16 heures (J. Invest. Dermatol. 1995, 104 : 922-927). En présence du ligand PBR Ro 5-4864, il a été montré que l'on prévient les processus d'altérations cellulaires induits par l'irradiation dans une gamme de concentrations de ligand comprise entre 10 nM et 10 µM.

EXEMPLE 5

L'effet photoprotecteur du ligand a été évalué par application par voie cutanée sur le cobaye albinos.

La voie topique cutanée est utilisée afin de reproduire les conditions d'utilisation chez l'homme.

Des cobayes Hartley, Charles River France, Saint Aubin lès Elbeuf, 76410 Cléon, France, sont utilisés.

Les animaux ont été rasés puis épilés sur les flancs antérieurs droit et gauche, 24 heures avant le début du traitement.

Les animaux ont été irradiés juste avant le premier traitement. L'énergie est vérifiée avant chaque irradiation réalisée sur les flancs droit et gauche dans le spectre UVB à une dose de 4000 mJ/cm².

Le flanc droit des animaux a été traité avec 0,2 ml de solution du ligand immédiatement après irradiation puis 2 et 5 heures après irradiation. Le flanc gauche ne sera pas traité.

Une lampe à vapeur de Xéron Haute pression (IDEM 300) produira l'irradiation.

Les lectures des réactions locales sont faites avant traitement, puis 5 et 24 heures après irradiation.

Erythème et oedème ont été évalués comme suit :

Erythème

0 pas d'érythème ; 1 érythème très faible, à peine perceptible ; 2 érythème net, rose faible ; 3 érythème net, rouge franc ; 4 érythème particulièrement intense

Oedème

0 pas d'oedème ; 1 très léger oedème (à peine visible) ; 2 léger oedème (contours bien définis et gonflement apparent) ; 3 oedème moyen (épaisseur d'environ 1 mm) ; 4 oedème grave (épaisseur supérieure à 1 mm et surface supérieure à la zone

d'application)

Des exemples de ligands naturels du recepteur PBR produits par fermentation sont décrits ci-après avec leur activité.

- 5 Un criblage ou screening effectué sur des extraits de microorganismes conduit sur milieu solide ou liquide a permis de sélectionner trois souches de microorganismes (bactéries et champignons microscopiques).

Les trois souches sélectionnées après différentes études menées pour optimiser les conditions de production de quantités significatives d'extraits de cultures possédant de
10 bonnes activités sur le test de mesure d'interaction avec le récepteur PBR ont pour références SRL 4988, SRL 5186 et SRL 5189.

Les trois souches ci-dessus ont été déposées à la CNCM de l'Institut Pasteur : date de 27 août 1999 avec respectivement les numéros d'ordre I-2305, I-2306, I-2307.

La souche SRL 4988 classée comme *Nocardia species*, isolée d'un échantillon de sol
15 a pour caractères écologico-physiologiques, déterminés après culture de deux semaines à 28° C sur milieu ISP2 : phototrophe négatif, chimio-organotrophe, mésophile et halophile négatif. Elle est non mobile et présente des spires ouvertes, non verticillées.

La souche SRL 5186 classée comme *Streptomyces species*, isolée d'un échantillon de
20 sol a pour caractères écologico-physiologiques, déterminés après culture de deux semaines à 28° C sur milieu ISP2 : phototrophe négatif, chimio-organotrophe, mésophile et halophile négatif. Elle est non mobile et présente des hyphes flexibles et biverticillées.

La souche SRL 5189 classée comme *Actinosynnema species* a pour caractères
25 écologico-physiologiques, déterminés après culture de deux semaines à 28° C sur milieu ISP2 : phototrophe négatif, chimio-organotrophe, mésophile, halophile négatif. Elle est non mobile et présente des hyphes flexibles et monoverticillés.

Ces souches constituent donc, ainsi que leurs mutants producteurs, un objet ultérieur de l'invention.

30 Après cultures sur milieu nutritif gélosé et plusieurs repiquages successifs qui permettent d'obtenir une culture abondante et pure, on fabrique un lot 0 de conservation de la souche mère puis des lots de semence primaire et secondaire.

Pour cela, on prépare une suspension de spores à partir d'une culture sur milieu nutritif gélosé en boîte de Pétri et d'un milieu de reprise ; ce milieu contient un
35 cryoprotecteur permettant d'assurer une bonne viabilité des spores lors de la conservation par congélation.

La suspension de spores obtenue est répartie dans des cryotubes qui seront conservés à - 80° C : ces tubes constituent le lot 0.

En suivant le même protocole, mais à partir d'un tube du lot 0, on prépare un lot de semence primaire. Puis toujours suivant le même protocole, on prépare un lot de semence secondaire à partir d'un cryotube de semence primaire. La fabrication des lots de semence 0, 1 et 2 assure une accessibilité durable de la souche et donc de l'activité recherchée. Les cultures de ces trois souches permettant d'obtenir des ligands naturels du récepteur PBR peuvent être menées de manière proche avec les moyens de cultures aérobies habituels, c'est-à-dire milieux liquides en fermenteurs de toute capacité avec contrôle en ligne du pH et de l'aération.

EXEMPLE A SRL 4988

A titre d'exemple de culture en fioles d'Erlenmeyer pour la souche SRL 4988 : un tube de semence secondaire est utilisé pour ensemercer des boîtes de Pétri préparées avec un milieu favorisant la sporulation des actinomycètes selon la composition :

Glucose	20 g
Soyoptim (SIO)	10 g
CaCO ₃ (OMYA)	3 g
Agar type E	20 g
Eau distillée QSP	1 l

On fait incuber les cultures sur boîtes pendant 5 jours à 28° C. On obtient alors une suspension de spores en ajoutant dans chaque boîte de Pétri, 10 ml d'un milieu liquide de composition :

Glucose	30 g
Soyoptim (SIO)	10 g
Tryptone U.S.P. (BIOKAR)	4 g
Extrait de levures (DIFCO)	8 g
NaCl	2,5 g
CaCO ₃	5 g
Hydrolysate de caséine	5 g
Peptone papaïnique de soja	5 g

dont le pH est ajusté à 7,0 avant stérilisation.

- 5 On utilise 5 ml des suspensions de spores pour inoculer des fioles stériles de 250 ml, garnies avec 50 ml du même milieu, qui constituent les précultures, mises à incuber en chambre chaude à 28° C sur un agitateur à étagères, ou dans un incubateur autonome, les vitesses de rotation sur l'un ou l'autre des systèmes étant réglées à 210 tours/mn.

- 10 Après deux jours d'agitation les fioles de préculture sont utilisées pour ensemen- cer les fioles de culture proprement dites à raison de 5 ml de milieu de préculture par Erlenmeyer de 500 ml garni de milieu de culture (100 ml) de composition :

Glycérol	10 g
Amidon soluble	30 g
Soyoptim	15 g
Tryptone	2 g
Extrait de levure	5 g
CaCO ₃	5 g
Solution d'oligoéléments	10 ml
Eau QSP	1 l
pH 7	

Composition de la solution d'oligoéléments utilisée :

15

FeSO ₄ , 7 H ₂ O	1,0 g
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,025 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,10 g
H ₃ BO ₃	0,56 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	0,002 g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,20 g
Eau QSP	1 l

Ainsi dans ce cas précis , 5 fioles de précultures ont été utilisées pour inoculer 40 fioles de cultures à 100 ml de milieu de culture par Erlenmeyer de 500 ml , qui après 6

jours de culture agitée à 28° C en chambre chaude sur un agitateur rotatif réglé à 210 tours/mn , fournissent 4 litres de suspension de bactéries.

Les 4 litres de moût de fermentation sont centrifugés en plusieurs opérations, à une température de 4°C, et au régime de 13500 tours/mn (soit 27 500g avec le rotor utilisé), afin de séparer la biomasse, c'est à dire le culot rassemblant les cellules du surnageant de culture constitué majoritairement d'eau provenant du milieu nutritif utilisé et contenant en solution des restes de composants du milieu nutritif ainsi que des métabolites produits et excrétés par les cellules des bactéries pendant les diverses phases de leur croissance .

Les biomasses et surnageants sont alors congelés à -20° C .

EXTRACTION DES LIGANDS NATURELS DU RECEPTEUR PBR

Les 4 litres de surnageant décongelé sont chargés dans un b cher de 10 litres. On additionne la solution de 400 g de résine polystyrène-divinylbenzène Amberlite XAD 16 (Rohm & Haas). La suspension est agit e avec un moteur équipé d'un arbre à pales, tournant à 20 tours/mn, pendant 15 heures. La solution est ensuite filtrée, le filtrat est éliminé et la résine essor e est reprise par 1 litre de méthanol. On laisse sous agitation douce pendant 1 heure. On filtre à nouveau la résine que l'on retraits à l'identique avec 1 litre de méthanol. Lors d'une troisième opération la résine est retraits cette fois avec 1 litre d'acétone. La résine essor e est alors  limin e et les 3 litres de solvant organique rassemblés sont évaporés à sec dans un évaporateur rotatif sous vide.

Le résidu d'évaporation (17,7g) est trituré avec 50 ml de méthanol, la suspension obtenue est centrifug e à 3000 tours/mn pendant 15 minutes, et le surnageant décanté obtenu constitue l'extrait de surnageant de culture.

Cet extrait est testé en dilution en inhibition du binding sur le récepteur PBR et fournit une activité  valu e au 1/200 (50 % d'inhibition).

Les biomasses rassembl es (199g) dans un b cher de 2 litres sont trait es sous agitation par un mélange de 750 ml de chlorure de méthylène et de 750 ml de méthanol. L'agitation est maintenue pendant 15 heures à température ambiante. La suspension est ensuite filtrée et la solution limpide obtenue est concentr e sous vide dans un évaporateur rotatif. Le résidu d'évaporation (5,4g) est alors trituré avec 50 ml de méthanol et constitue l'extrait de biomasse .

Cet extrait est testé en inhibition du binding du récepteur PBR et fournit une activité mesur e au 1/2200 ($DI_{50} = 2200^{-1}$).

EXEMPLE B SRL 5186

Avec les mêmes protocoles et milieux respectifs :

- milieu gélosé pour les repiquages sur boîte de Pétri
- milieu liquide de préculture

5 - milieu liquide de production ,

14 fioles d'Erlenmeyer de 500 ml garnies de 100 ml de milieu de production, et inoculées à 5 %, sont incubées à 28 °C en chambre chaude sur un agitateur rotatif tournant à 210 tours/mn, pendant 6 jours .

Après centrifugation et stockage un à deux jours au congélateur à - 20°C des biomasses et surnageants de production, on décongèle ces produits avant de
10 procéder à leur extraction .

Les biomasses (54,9 g) sont traitées dans un bécher, sous agitation par un mélange de 250 ml de dichlorométhane et 250 ml de méthanol , pendant une dizaine d'heures. La suspension est ensuite filtrée et la solution limpide obtenue est concentrée à sec
15 avec un évaporateur rotatif.

Le résidu sec (1,4 g) est trituré avec 17,5 ml de méthanol, et la suspension obtenue est centrifugée à 3000 tours/mn pendant 15 minutes. Le surnageant de centrifugation prélevé, constitue l'extrait de biomasse.

Cet extrait, évalué en dilution sur le test d'inhibition du binding au récepteur PBR
20 fournit une inhibition de 50 % dans le test à la dilution 1/3750 ($DI_{50} = 3750^{-1}$) .

Les 1400 ml de surnageant décongelé sont additionnés de 160 g de résine polystyrène-divinylbenzène XAD 16 (Rohm & Haas) et la suspension est agitée pendant 15 heures. La résine est filtrée, le filtrat est éliminé et la résine est retraitée par 200 ml de solution à 25 % de méthanol dans l'eau pendant 3 heures.

25 La résine est filtrée, et ce deuxième filtrat est éliminé. La résine subit alors trois traitements semblables, deux avec 200 ml de méthanol et le dernier avec 200 ml d'acétone. Ces trois derniers filtrats sont rassemblés dans un ballon puis concentrés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec obtenu (2,2 g) est alors trituré avec 17,5 ml de méthanol et la solution obtenue constitue l'extrait de surnageant .

30 Cet extrait évalué en dilution sur le test d'inhibition du binding au récepteur PBR donne une inhibition de 50 % à la dilution 1/940 ($DI_{50} = 940^{-1}$)

EXEMPLE C SRL 5189

Avec les mêmes protocoles et milieux respectifs :

- milieu gélosé pour les repiquages sur boîte de Pétri
- milieu liquide de préculture
- 5 - milieu liquide de production

10 fioles d'Erlenmeyer de 500 ml garnies de 100 ml de milieu de production, et inoculées à 5 %, sont incubées à 28 °C en chambre chaude sur un agitateur rotatif tournant à 210 tours/mn, pendant 8 jours.

Après centrifugation et stockage un à deux jours au congélateur à - 20°C des biomasses et surnageants de production, on décongèle ces produits avant de procéder à leur extraction.

Les biomasses (69,5 g) sont traitées dans un bécher, sous agitation par un mélange de 150 ml de dichlorométhane et 150 ml de méthanol pendant une dizaine d'heures. La suspension est ensuite filtrée et la solution limpide obtenue est concentrée à sec avec un évaporateur rotatif. Le résidu sec (1,5 g) est trituré avec 12,5 ml de méthanol, et la suspension obtenue est centrifugée à 3000 tours/mn pendant 15 minutes. Le surnageant de centrifugation prélevé, constitue l'extrait de biomasse . Cet extrait, évalué en dilution sur le test d'inhibition du binding au récepteur PBR fournit une inhibition de 50 % dans le test à la dilution 1/2600 ($DI_{50} = 2600^{-1}$).

Les 1000 ml de surnageant décongelé sont additionnés de 100 g de résine polystyrène-divinylbenzène XAD 16 (Rohm & Haas) et la suspension est agitée pendant 15 heures. La résine est filtrée, le filtrat est éliminé et la résine est retraitée par 150 ml de solution à 25 % de méthanol dans l'eau pendant 3 heures. La résine est filtrée, et ce deuxième filtrat est éliminé. La résine subit alors trois traitements semblables, deux avec 150 ml de méthanol et le dernier avec 150 ml d'acétone. Ces trois derniers filtrats sont rassemblés dans un ballon puis concentrés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec obtenu (1,7 g) est alors trituré avec 12,5 ml de méthanol et la solution obtenue constitue l'extrait de surnageant .

Cet extrait évalué en dilution sur le test d'inhibition du binding au récepteur PBR donne une inhibition de 50 % à la dilution 1/600 ($DI_{50} = 500^{-1}$) .

Dans les compositions selon l'invention, la substance se liant à PBR est utilisée de préférence en une quantité allant de 0,00001 à 20 % en poids par rapport au poids total de la composition, et en particulier en une quantité allant de 0,001 à 10 % en poids par rapport au poids total de la composition.

Les compositions selon l'invention peuvent se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées pour une application topique.

Les quantités des différents constituants des compositions selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés et sont appropriées à leur forme galénique.

5

Pour une application topique, les compositions de l'invention comprennent un milieu compatible avec la peau. Ces compositions peuvent se présenter notamment sous forme de solutions aqueuses, alcooliques ou hydroalcooliques, de gels, d'émulsions eau-dans-huile ou huile-dans-eau ayant l'aspect d'une crème ou d'un gel, de

10 microémulsions, d'aérosols, ou encore sous forme de dispersions vésiculaires contenant des lipides ioniques et/ou non ioniques. Ces formes galéniques sont préparées selon les méthodes usuelles des domaines considérés.

Ces compositions à application topique peuvent constituer notamment une composition de protection, de traitement ou de soin cosmétique ou dermatologique pour le visage, pour le cou, pour les mains ou pour le corps, (par exemple crèmes de

15 jour, crèmes de nuit, crèmes ou huiles solaires, laits corporels), une composition de maquillage (par exemple fond de teint) ou une composition de bronzage artificiel.

Quand la composition de l'invention est une émulsion, la proportion de corps gras qu'elle contient peut aller de 5 % à 80 % en poids, et de préférence de 5 % à 50 % en

20 poids par rapport au poids total de la composition. Les corps gras et les émulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine cosmétique ou dermatologique.

Comme corps gras utilisables dans l'invention, on peut citer les huiles minérales (vaseline), les huiles végétales (fraction liquide de beurre de karité) et leurs dérivés hydrogénés, les huiles animales, les huiles de synthèse (perhydrosqualène), les huiles

25 siliconées (diméthylpolysiloxane) et les huiles fluorées. Comme autres corps gras, on peut encore citer les alcools gras (alcool cétylique, alcool stéarylique), les acides gras (acide stéarique) et les cires.

Les émulsionnants peuvent être présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3 % à 30 % en poids et de préférence de 0,5 à 30 % en poids par rapport

30 au poids total de la composition.

De façon connue, les compositions cosmétiques ou dermatologiques de l'invention peuvent contenir également des adjuvants habituels dans les domaines correspondants, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les

35 antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres et les matières colorantes. Par ailleurs, ces compositions peuvent contenir des actifs hydrophiles ou

lipophiles. Les quantités de ces différents adjuvants ou actifs sont celles classiquement utilisées dans le domaine cosmétique au dermatologique, et par exemple de 0,01 % à 20 % du poids total de la composition. Ces adjuvants ou ces actifs, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse et/ou dans des vésicules lipidiques.

Parmi les actifs que peuvent contenir les compositions de l'invention, on peut notamment citer les actifs ayant un effet sur le traitement des rides ou des ridules, et en particulier les actifs kératolytiques. Par kératolytique, on entend un actif ayant des propriétés desquamantes, exfoliantes ou gommantes, ou un actif capable de ramollir la couche cornée.

Parmi ces actifs ayant un effet sur le traitement des rides ou des ridules que peuvent contenir les compositions de l'invention, on peut en particulier citer les hydroxyacides et les rétinoïdes.

Les hydroxyacides peuvent être par exemple des α -hydroxyacides ou des β -hydroxyacides, qui peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés. Les atomes d'hydrogène de la chaîne carbonée peuvent, en outre, être substitués par des halogènes, des radicaux halogénés, alkylés, acylés, acyloxylés, alcoxy carbonylés ou alcoylés ayant de 2 à 18 atomes de carbone.

Les hydroxyacides qui peuvent être utilisés sont notamment les acides glycolique, lactique, malique, tartrique, citrique, hydroxy-2 alcanoïque, mandélique, salicylique, ainsi que leurs dérivés alkylés comme l'acide n-octanoyl-5-salicylique, l'acide n-dodécanoyl-5-salicylique, l'acide n-décanoyl-5-salicylique, l'acide n-octyl-5-salicylique, l'acide n-heptyloxy-5 ou -4-salicylique, l'acide 2-hydroxy-3-méthylbenzoïque, ou encore leurs dérivés alcoylés comme l'acide 2-hydroxy-3-méthoxybenzoïque.

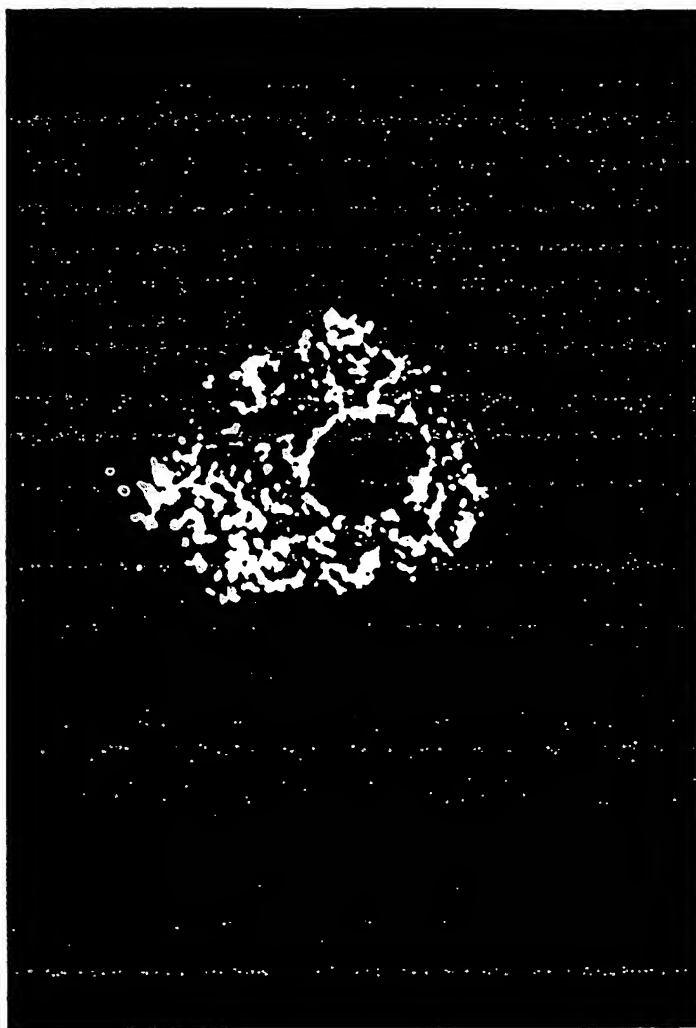
Les rétinoïdes peuvent être notamment l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol (vitamine A) et ses esters tels que le palmitate de rétinol, l'acétate de rétinol et le propionate de rétinol, ainsi que leurs sels.

Ces actifs peuvent être utilisés en particulier à des concentrations allant de 0,0001 % à 5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

REVENDICATIONS

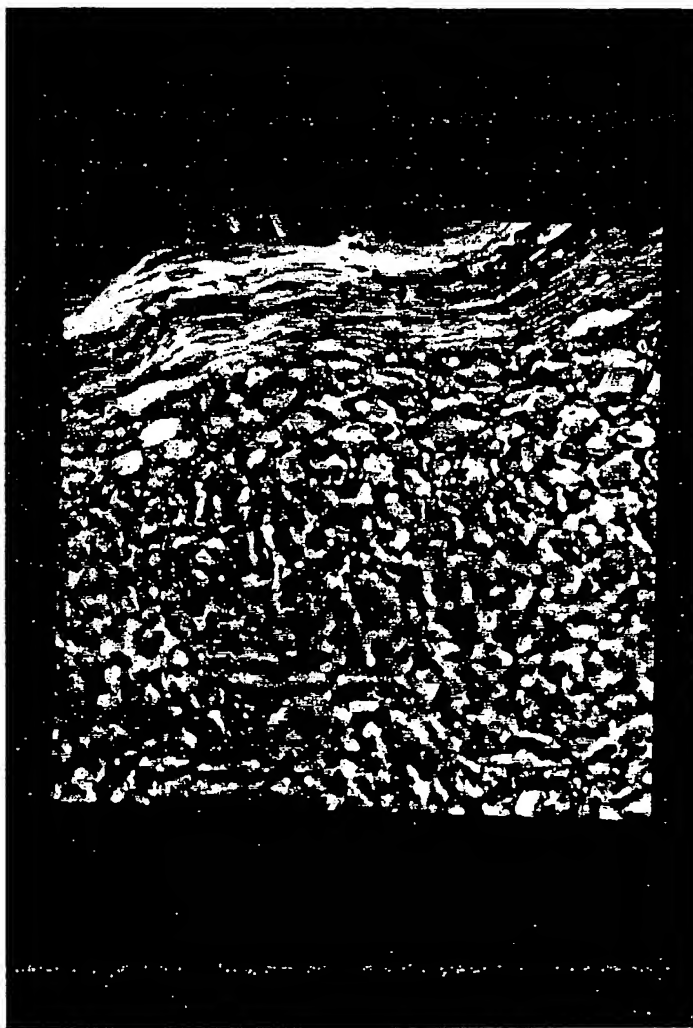
1. Utilisation d'au moins une substance se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines ou PBR, pour la fabrication d'une composition cosmétique, pharmacologique ou dermatologique topique dans le traitement du stress cutané.
2. Utilisation d'au moins une substance se liant au PBR pour la fabrication d'une composition cosmétique et/ou dermatologique topique en vue de diminuer les rides, de réduire l'érythème solaire ou de protéger contre les radicaux libres.
3. Utilisation selon l'une des revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la substance se liant au PBR est un agoniste du PBR choisi parmi les molécules de synthèse, les substances naturelles d'extraction ou une substance obtenue par fermentation.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que la substance se liant au PBR est le Ro 5-4864.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que la substance se liant au PBR est une substance obtenue par fermentation.
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la substance est présente dans la composition cosmétique ou dermatologique en une quantité allant de 0,00001 à 20 % en poids par rapport au poids total de la composition.
7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que la substance agoniste est présente dans la composition cosmétique ou dermatologique en une quantité allant de 0,001 à 10 % en poids par rapport au poids total de la composition.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la composition contient en outre un hydroxyacide et/ou un rétinoïde.
9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'hydroxyacide est choisi parmi les α -hydroxyacides ou les β -hydroxyacides, qui peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques, saturés ou insaturés.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que le rétinoïde est choisi dans le groupe comprenant l'acide rétinoïque que et ses dérivés, le rétinol et ses esters.
- 5 11. Composition cosmétique et/ou dermatologique topique caractérisée en ce qu'elle contient en tant que principe actif une substance se liant au PBR.
12. Souche *Nocardia species* SRL 4988 déposée auprès de la C.N.C.M. de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2305 et ses mutants producteurs.
- 10 13. Souche *Streptomyces species* SRL 5186 déposée auprès de la C.N.C.M. de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2306 et ses mutants producteurs.
14. Souche *Actinosynnema species* SRL 5189 déposée auprès de la C.N.C.M. de l'Institut Pasteur sous le numéro I-2307 et ses mutants producteurs.
- 15 15. Composition cosmétique et/ou dermatologique topique caractérisée en ce qu'elle contient en tant que substance active une substance obtenue par fermentation d'une souche selon les revendications 12 à 14.
- 20



Analyse en microscopie confocale à l'aide de l'anticorps 8D7
de la localisation mitochondriale du récepteur PBR
sur kératinocytes A431 (coloration verte).

FIGURE 1

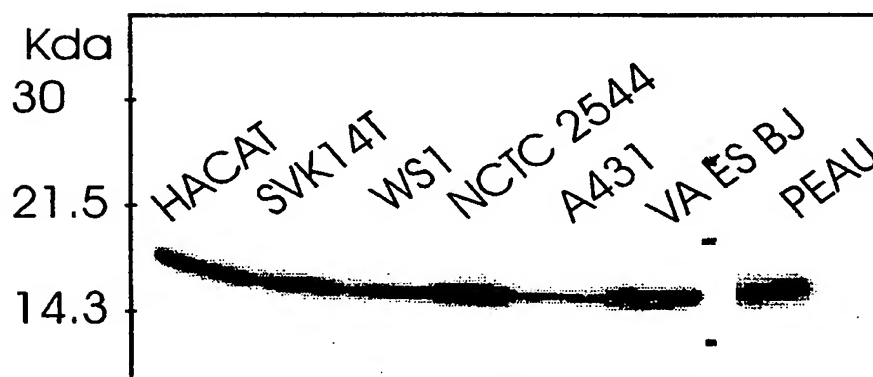


L'analyse immuno-histologique réalisée sur une coupe d'épiderme humain normal révèle une expression croissante de PBR du *stratum basale* vers le *stratum corneum* (coloration rouge).

FIGURE 2

Expression de PBR sur des lignées
de kératinocytes et de peau
humaine normale :

Analyse par Western Blot

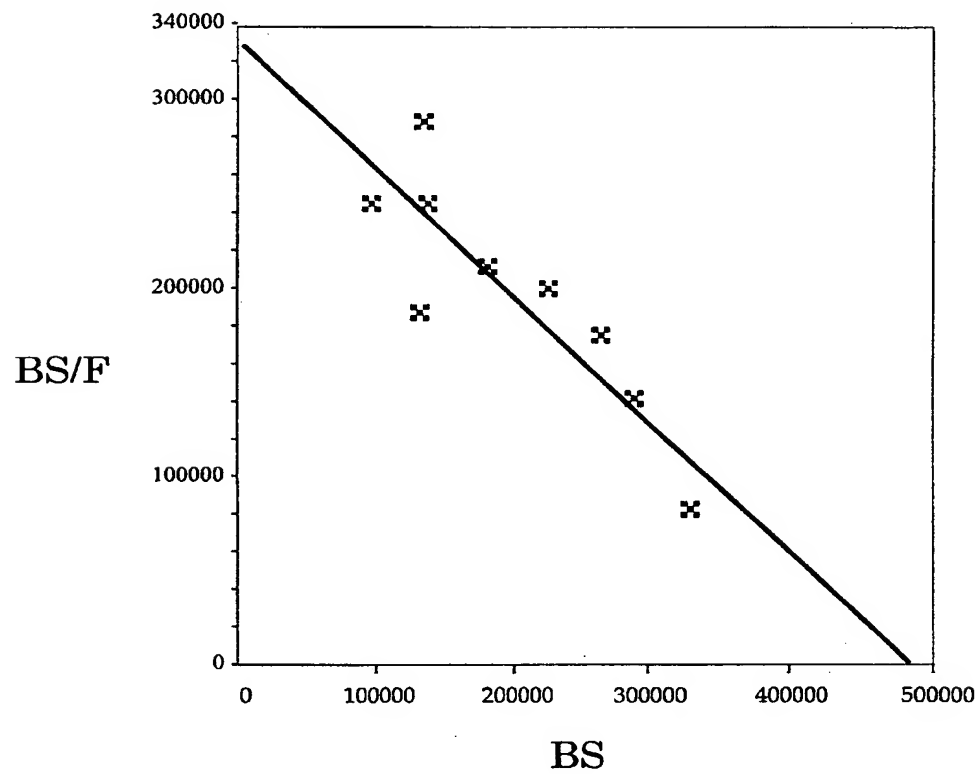


Marquage anticorps 8D7 ($1\mu\text{g} / \text{ml}$ final)

Les dépôts sont normalisés par dosage des protéines totales en lysat:
dépôts pour chaque lignée $30\mu\text{g}$

FIGURE 3

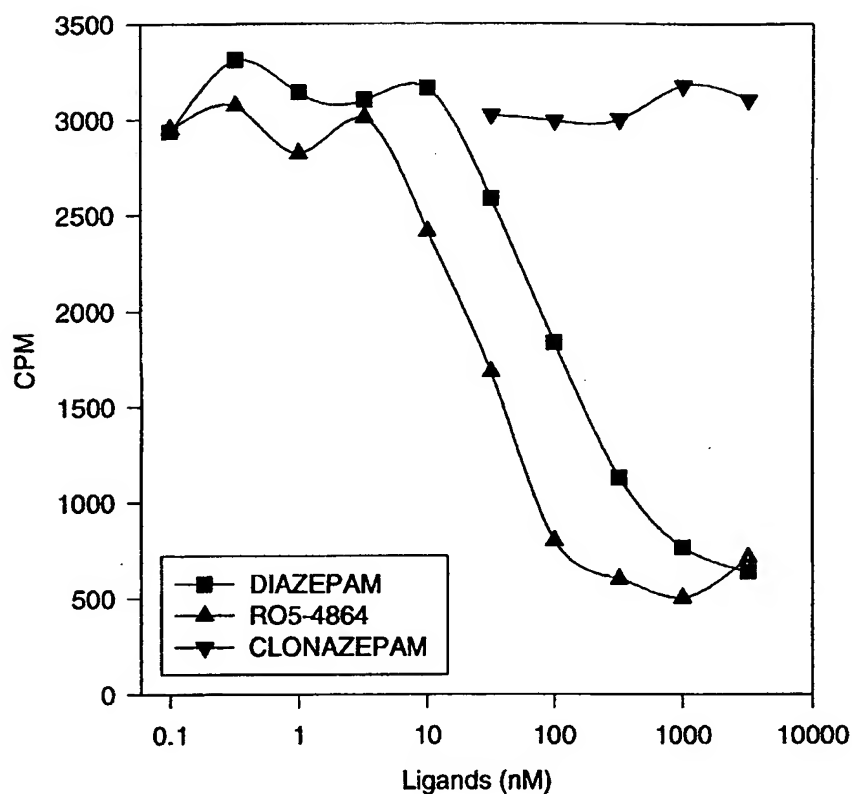
Etude de Scatchard sur Kératinocytes A431



$B_{max} = 472000 \pm 68000$ Récepteurs / Cellule

$KD = 1.5 \pm 0.3$ mM

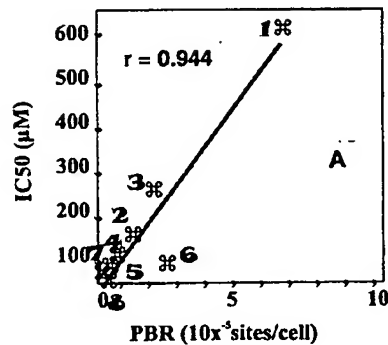
FIGURE 4

Profil pharmacologique des ligands du PBR sur Kératinocytes A431

Courbe de déplacement du ligand de référence [3H]-PK11195
par le Ro5-4864 (ligand périphérique) le clonazépam (ligand central)
et le diazépam (ligand mixte).

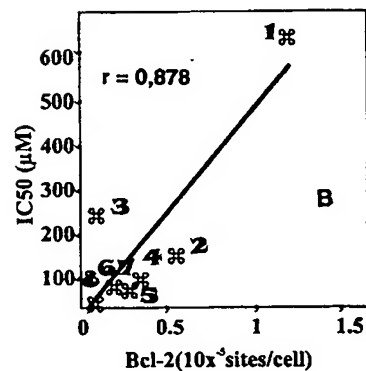
FIGURE 5

**Implication de PBR dans la protection des cellules hématopoïétiques
contre les dommages causés par les radicaux oxygénés**

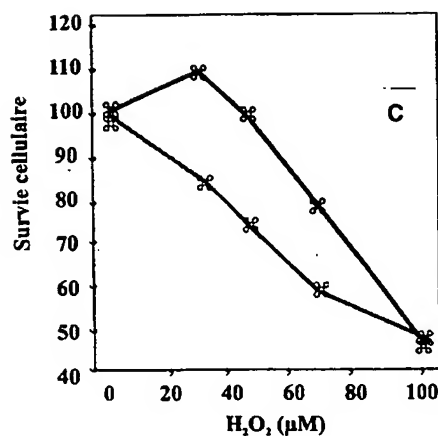


Corrélation entre le niveau d'expression de
PBR [A] et de Bcl-2 [B] et de la résistance à
la toxicité de H_2O_2

1 = THP₁ 2 = U937 3 = K562
4 = IM9 5 = CEM 6 = NALM-6
7 = JURKAT 8 = RAJI

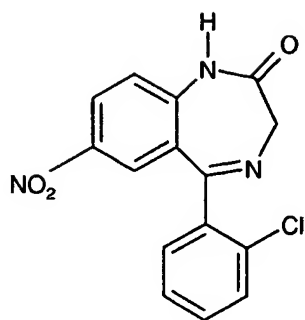


Les concentrations d' H_2O_2 induisant 50% de
toxicité après 24 H d'incubation [IC_{50}] sont
exprimées en fonction du nombre de sites
PBR ou Bcl-2.

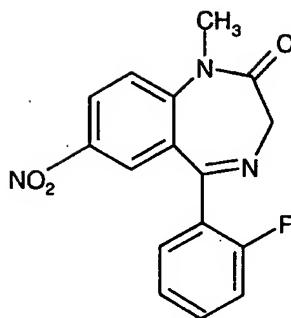


Viabilité des cellules JURKAT sauvages %
et transfectées avec le PBR % vis à vis de
la toxicité de H_2O_2 après 24 H d'incubation

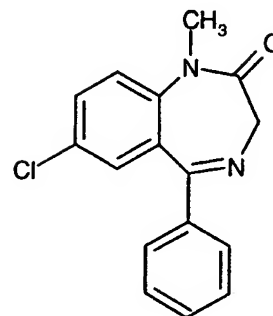
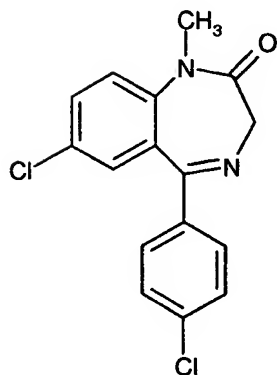
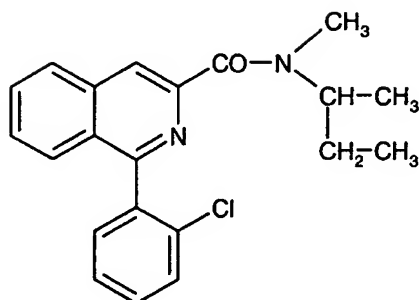
FIGURE 6



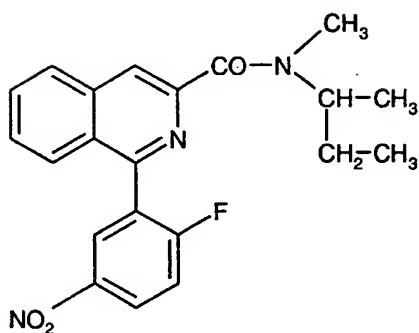
CLONAZEPAM



FLUNITRAZEPAM

DIAZEPAM
Ro 5-2807CHLORODIAZEPAM
Ro 5-4864

PK 11195



PK 14105

**Principaux ligands des récepteurs centraux et
périphériques des benzodiazépines**

FIGURE 7



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 7/48	A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/28947 (43) Date de publication internationale: 25 mai 2000 (25.05.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02761 (22) Date de dépôt international: 10 novembre 1999 (10.11.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/14387 17 novembre 1998 (17.11.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SANOFI-SYNTHELABO [FR/FR]; 174, avenue de France, F-75013 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CASELLAS, Pierre [FR/FR]; 10, rue Carl Von Linne, La Colombe, F-34090 Montpellier (FR). DEROCQ, Jean-Marie [FR/FR]; 6, rue des Clauzes, F-34570 Murviel les Montpellier (FR). (74) Mandataire: THOURET-LEMAITRE, Elisabeth; Sanofi-Synthelabo, Service Brevets, 174, avenue de France, F-75013 Paris (FR).	(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 3 août 2000 (03.08.00)	
(54) Title: USE OF A SUBSTANCE BINDING WITH THE PERIPHERAL BENZODIAZEPIN RECEPTOR FOR TREATING SKIN STRESS (54) Titre: UTILISATION D'UNE SUBSTANCE SE LIANT AU RECEPTEUR PERIPHERIQUE DES BENZODIAZEPINES DANS LE TRAITEMENT DES STRESS CUTANES (57) Abstract <p>The invention concerns the use of a substance specifically binding with the peripheral benzodiazepin receptor (PBR) for making a composition for preventing or treating skin stress. The invention also concerns compositions containing said substances. Said compositions can be cosmetic or pharmaceutical, in particular for topical use in dermatology.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne l'utilisation d'une substance se liant spécifiquement au récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) pour la fabrication d'une composition pour la prophylaxie ou le traitement des stress cutanés. L'invention concerne également les compositions contenant ces substances. Ces compositions peuvent être cosmétiques ou pharmaceutiques, en particulier dermatologiques topiques.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 99/02761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEVY: "A psychosomatic approach to the management of recalcitrant dermatoses" PSYCHOSOMATICS, vol. 4, no. 6, November 1963 (1963-11), pages 334-337, XP000878884 the whole document	1-3
X	ORMFA ET AL.: "Ricerche preliminari clinico psicologiche su di un nuovo derivato benzodiazepinico (Nobrium) in dermatologia" GIORNALE ITALIANO DI DERMATOLOGIA. MINERVA DERMATOLOGICA, vol. 45, no. 5, May 1970 (1970-05), pages 325-339, XP000878885 the whole document	1-3

	---/---	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 May 2000

Date of mailing of the international search report

15. MAI 2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alvarez Alvarez, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 99/02761

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CARAYON ET AL.: "Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection..." BLOOD, vol. 87, no. 8, April 1996 (1996-04), pages 3170-3178, XP002091195 cited in the application discussion figure 4	
A	BOH: "Role of reactive oxygen species in dermatologic diseases" CLINICS IN DERMATOLOGY, vol. 14, no. 4, July 1996 (1996-07), pages 343-352, XP000878889	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02761

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: -
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet INFORMATION FOLLOW-UP PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-13, 15 (partly)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1-12 (wholly) and 15 (partly)

Use of substances binding with the peripheral benzodiazepine receptor in cosmetics, pharmacology or dermatology, their compositions, method for obtaining the active substance by fermentation of the *Nocardia* sp. SRL 4988 strain and the strain itself.

2. Claims: 1-11, 13 (wholly) and 15 (partly)

Use of substances binding with the peripheral benzodiazepine receptor in cosmetics, pharmacology or dermatology, their compositions, method for obtaining the active substance by fermentation of the *Streptomyces* sp. SRL 5186 strain and the strain itself.

3. Claims: 1-11, 14 (wholly) and 15 (partly)

Use of substances binding with the peripheral benzodiazepine receptor in cosmetics, pharmacology or dermatology, their compositions, method for obtaining the active substance by fermentation of the *Actinossinema* sp. SRL 5189 strain and the strain itself.

Continuation of Box I.2

Claims 1-11 of the present application concern a product/compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely, the capacity to bind with the peripheral benzodiazepine receptor (PBR)

The claims cover all the products/compounds having said characteristic or property, whereas the application provides a support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 for only a very limited number of such products/compounds. In the present case, the claims are so lacking in support basis and the application is so lacking in disclosure that it is not possible to carry out any significant search on the whole scope covered by the claims. Notwithstanding the reasons stated above, the claims also lack clarity. Indeed, there has been an attempt to define the product/compound by the result to be achieved. In the present context, said lack of clarity is likewise such that it is not possible to carry out any significant search on the whole scope covered by the claims. Consequently, the search was carried out only for those parts of the claims whereof the subject matter is deemed to be clear, supported and properly disclosed.

Search was carried out for all the claims but the search was limited to the benzodiazepines themselves and particularly to the compounds mentioned in Claim 4 and in figure 7. (PCT Article 17.2)

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1 (e)). The applicant is advised that the guideline adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with a preliminary examination of a subject matter unless a search has been carried out thereon. This position will remain unchanged, notwithstanding that the claims have or have not been modified, either after receiving the search report, or during any procedure under Chapter II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. nde Internationale No

PCT/FR 99/02761

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K7/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEVY: "A psychosomatic approach to the management of recalcitrant dermatoses" PSYCHOSOMATICS, vol. 4, no. 6, novembre 1963 (1963-11), pages 334-337, XP000878884 le document en entier ---	1-3
X	ORMFA ET AL.: "Ricerche preliminari clinico psicologica su di un nuovo derivato benzodiazepinico (Nobrium) in dermatologia" GIORNALE ITALIANO DI DERMATOLOGIA. MINERVA DERMATOLOGICA, vol. 45, no. 5, mai 1970 (1970-05), pages 325-339, XP000878885 le document en entier --- -/--	1-3

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Alvarez Alvarez, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De .de Internationale No

PCT/FR 99/02761

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>CARAYON ET AL.: "Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection..." BLOOD, vol. 87, no. 8, avril 1996 (1996-04), pages 3170-3178, XP002091195 cité dans la demande discussion figure 4</p>	
A	<p>BOH: "Role of reactive oxygen species in dermatologic diseases" CLINICS IN DERMATOLOGY, vol. 14, no. 4, juillet 1996 (1996-07), pages 343-352, XP000878889</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR 99/02761

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} –
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. ☒ Les revendications n^{os} –
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210

3. ☐ Les revendications n^{os}
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. ☒ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
1-13, 15 (partiellement)

4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☒ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-12 (totalement) et 15 (partiellement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche Nocardia sp. SRL4988 et la souche même.

2. revendications: 1-11, 13 (totalement) et 15 (partiellement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche Streptomyces sp. SRL 5186 ainsi que la souche même.

3. revendications: 1-11, 14 (totalement) et 15 (partiellement)

Utilisation des substances se liant au récepteur périphérique des benzodiazépines en cosmétique, pharmacologie ou dermatologie, leurs compositions, l'obtention de la substance active par fermentation de la souche Actinossinema sp. SRL 5189 et la souche même.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1-11 présentes ont trait à un produit/composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir, la capacité de liason au récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR)

Les revendications couvrent tous les produits/composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels produits/composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le produit/composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé.

Toutes les revendications ont été recherchées mais la recherche a été limitée aux benzodiazépines mêmes et spécialement aux composés mentionnés dans la revendication 4 et la figure 7. (Art. 17.2 PCT)

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.